

난소 절제 동물모델을 이용한 경옥고의 갱년기 증후군 개선 효과

조경남¹ · 정서윤¹ · 배호정¹ · 류종훈^{1,2*}

¹경희대학교 나노의약생명과학과, ²경희대학교 한약학과

The Ameliorating Effect of Kyung-Ok-Go on Menopausal Syndrome Observed in Ovariectomized Animal Model

Kyungnam Cho¹, Seo Yun Jung¹, Ho Jung Bae¹, and Jong Hoon Ryu^{1,2*}

¹Department of Life and Nanopharmaceutical Sciences, Kyung Hee University, Seoul 02447, Korea

²Department of Oriental Pharmaceutical Science, College of Pharmacy, Kyung Hee University, Seoul 02447, Korea

Abstract – Kyung-Ok-Go (KOK) is a traditional prescription used for debilitating natural aging and post-illness debilitation. KOK has been used in a variety of ways because it strengthens immunity, prevents illness, and helps recovery in case of illness. In particular, recent research has revealed that KOK helps improve memory and cognition. Therefore, in this study, we investigated whether KOK was effective in improving memory decline and depression-state observed during menopause. In the present study, we employed ovariectomized mouse as an animal model for measuring menopausal syndrome. The administration of KOK for 8 weeks, the object recognition memory and working memory were improved in novel object recognition test and Y-maze test. And in the forced swimming test, the immobility time were decreased. Additionally, the expression level of mature brain derived neurotropic factor (mBDNF) was increased by KOK administration in ovariectomized mouse hippocampus. These results suggested that KOK could improve cognitive decline and depression during menopausal period, and it might be come from enhancing expression level of mBDNF in hippocampus.

Keywords – Kyung-Ok-Go, Menopausal syndrome, Cognitive function, Depression, BDNF

폐경(menopause)은 48~52세의 여성에게서 지속되던 월경이 완전히 끝나는 현상을 말하며, 특별한 원인이 없이 1년 동안 월경이 없을 때로 정의한다.¹⁾ 또한, 폐경기(postmenopause)는 폐경 후 남은 생의 기간을 의미하며 갱년기(perimenopause)는 점진적으로 난소의 기능이 소실되어 가는 시기 즉, 폐경 전후 3~4년 간을 의미한다. 이러한 폐경기에는 생리적으로 필요 수준 이하의 estrogen이 분비되는데, 그 결과 안면 홍조, 생식기 위축, 배뇨장애, 골다공증, 지질대사 이상, 우울증, 기억력저하, 불면증, 피부의 노화 등 여러 증상이 나타나며, 이러한 증상을 ‘갱년기 증후군’ 이라고 한다.^{2,3)}

현재 갱년기장애 개선 및 치료를 위하여 많은 약물 요법들이 적용되고 있으며, 대표적으로 호르몬 대체 요법이 많이 사용되고 있다. 그러나 호르몬 대체 요법은 과량의 estrogen으로 인하여 자궁내막암, 심장질환을 비롯하여 유방암의 발생빈도를 증가시키는 것으로 알려져 있다.⁴⁾ 이에 갱

년기 증상을 완화시키고 만성질환의 발생을 예방할 수 있도록 하는 관리 방안의 제시가 필요하며, 합성호르몬 치료의 부작용을 줄일 수 있는 갱년기장애 예방 소재의 개발이 필요하다. 따라서 최근에는 천연물 또는 천연물 복합제를 이용한 갱년기 증상 개선에 많은 관심을 가지고 있는 것도 사실이다.^{5,6)}

경옥고는 복령(Poria Cocos), 인삼(Ginseng Radix), 지황(Rehmanniae Radix), 꿀로 구성된 전통처방으로 동의보감에 연년익수(延年益壽)의 처방 중 하나로 기재되어 있으며, 허약해진 신체 상태를 개선하고 노화를 늦추는 효능이 있는 것으로 설명되어 있어, 여성의 폐경 또한 노화와 연관이 있기 때문에 경옥고가 갱년기 증상을 완화시키는 데 기여할 수 있다는 것을 충분히 예상할 수 있다. 특히 경옥고의 구성 생약 중 인삼에 함유되어 있는 ginsenoside Rg1, Rb1, Re은 식물성 estrogen(phytoestrogen)으로 작용하는 것으로 보고되고 있다.⁷⁻⁹⁾ 더불어, 인삼의 ginsenoside와 지황은 여러 치매 동물모델에서 기억력 개선효과와 신경세포 보호활성을 가지고 있다고 보고되어 있으며,¹⁰⁻¹²⁾ 경옥고 역시

*교신저자(E-mail): jhryu63@khu.ac.kr
(Tel): +82-2-961-9230

scopolamine과 전뇌 허혈로 유도한 기억력 감퇴 동물 모델에서 효과가 있음이 보고되었다.^{13,14)} 또한, 경옥고의 구성약물이 스트레스로 유도된 우울증 동물모델에서 효과가 있음이 보고되었으나,¹⁵⁻¹⁷⁾ 난소가 절제된 갱년기 동물 모델에서 경옥고 투여에 의한 기억력, 우울증 개선 효과는 보고된 적이 없다.

본 연구에서는 난소절제(ovariectomy OVX)된 동물 모델을 이용하여, Y자 미로 시험 및 새로운 물체 인식실험, 강제 수영 시험을 통해 경옥고의 갱년기 증상 중 인지력 결핍 및 우울증 개선 효능을 평가하고, Western blot을 통해 관련된 분자생물학적 기전을 탐색하였다. 난소절제를 통해 유도된 갱년기 증후군 동물에서 경옥고 투여에 의한 증상 개선 효능이 있다면, 경옥고가 여성 갱년기 증상 개선과 예방에 사용될 수 있는 치료제로서 가치가 있다고 사료된다.

재료 및 방법

실험동물 - 암컷의 ICR mouse 7주령(25-30 g)을 주식회사 오리엔트(경기도 성남시 중원구 상대원동)에서 공급받아 사용하였다. 실험동물은 1주일간 적응시켰으며 적응기간 동안 동물실의 온도는 23±1°C, 습도 60±10% 내외, 명암주기 12시간 주기로 일정하게 유지하였다. 실험동물은 적응기간 동안 사료와 물을 제한 없이 공급 받았으며, 동물실험은 경희대학교의 동물실험윤리위원회(IACUC)의 승인(동물승인번호;KHUASP(SE)-19-320)을 받아 이루어졌다.

실험재료 - 실험에서 사용한 경옥고(Kyung-Ok-Go, KOK)는 광동제약(주)에서 제공받아 사용하였다. 제공된 경옥고는 생지황(*Rehmannia glutinosa* Liboschitz var. *purpurea* Makino)(39.9 g)를 착즙하여 얻어진 즙에 복령가루(*Poria cocos* Wolf)(12.4 g), 인삼가루(*Panax ginseng* C. A. Meyer)(6.2 g), 꿀(41.5 g)을 넣어 94°C에서 120시간 증숙 이후 D-sorbitol을 혼합하여 35°C까지 냉각, 포장과정을 거쳤으며, 제품의 기준 및 시험방법에 따라 품질의 동질성을 확인하였다. 이외 Avertin, estradiol과 sesame oil은 Sigma-Aldrich Chemical Co(St.Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다.

마우스 난소 절제 수술(Ovariectomy) - Park 등의 방법에 근거하여 8주령의 ICR 마우스를 Avertin으로 마취시키고 등쪽 옆구리 부분을 가위로 절제하였다.¹⁸⁾ 난소를 꺼내 왼쪽과 오른쪽의 난소 아래 부분을 봉합사로 잘 묶은 다음 난소 부분을 절제하고 옆구리 부분을 봉합사로 마무리하고 소독한 후 항생제를 투여하고 히팅 패드에서 깨어날 때까지 체온을 유지한 후 갱년기 모델 마우스를 제작하였다. 수술 2주 동안 회복기를 거친 후 실험에 사용하였다.

약물투여 - 경옥고(Kyung-Ok-Go)의 투여용량은 임상 사용 용량을 기준으로 설정하였으며, 각각 투약은 200 mg/kg,

600 mg/kg 및 1800 mg/kg의 용량으로 증류수에 현탁하여 8주 동안 경구 투여하였다. 양성 대조군으로서 estradiol은 0.5 mg/kg의 농도로 sesame oil에 녹여 일주일에 두 번 피하주사하였다.¹⁹⁾

새로운 물체 인지 시험(Novel Object Recognition Test) - 새로운 물체 인지 시험은 인식기억(recognition memory)을 평가하는 실험으로 실험동물을 공간에 적응시키기 위하여 물체가 없는 상태에서 25×25×25 cm polyvinyl plastic 상자에서 매일 5분간 2일 동안 자유롭게 머물게 하였다. 적응이 끝나고 24시간 후에 실험을 수행하였다. Habituation 2일, training 1일, test 1일로 수행하였고, training 날에는 실험 실시 1시간 전에 경옥고 및 약물을 경구 투여하고 2개의 같은 물체가 있는 공간에 5분간 탐색하도록 했다. 탐색 24시간 후 상자 안 물체 한 개를 새로운 물체로 교체한 후 5분간 탐색하도록 하여 마우스가 기존에 있던 물체(familiar object)와 새로운 물체(novel object)를 탐색한 시간을 측정 후 각 물체에 대한 선호 비율(object preference ratio)과 차별 비율(discrimination ratio)을 계산하였다.

$$\text{Preference ratio(\%)} = \frac{T_{\text{novel}} \text{ or } T_{\text{familiar}}}{(T_{\text{novel}} + T_{\text{familiar}})} \times 100$$

$$\text{Discrimination ratio(\%)} = \frac{(T_{\text{novel}} - T_{\text{familiar}})}{(T_{\text{novel}} + T_{\text{familiar}})} \times 100$$

Y자 미로 시험(Y-maze test) - Y자 미로는 세 개의 가지로 구성되어 있는 검정색의 polyvinyl plastic으로 각 가지의 길이는 40 cm, 폭은 4 cm, 높이는 12 cm이고 사방이 막힌 미로로 세 가지가 접히는 각도는 120°이다. 각 가지를 A, B, C로 정한 후 한쪽 가지에 마우스를 조심스럽게 내려놓고 8분 동안 각 가지를 자유롭게 탐색할 수 있도록 한 다음, 마우스가 들어간 가지를 기록하였다. 3개의 다른 가지에 차례로 들어가면 1점(실제 변경, actual alternation)씩 부여하여 다음 공식으로 그 변경행동력을 계산하였다. 변경행동력이 높은 경우 단기기억이 높음을 의미한다.

$$\text{변경행동력(\%)} = \frac{\text{실제 변경 (actual alternation)}}{\text{최대변경 (maximum alternation)}} \times 100 \quad (\text{최대변경} = \text{총 입장 횟수} - 2)$$

강제 수영 시험(Forced Swimming Test) - 절망행동검이라고도 하는 강제 수영 시험은 우울증으로 인한 무력감을 평가하는 시험법이다. 좁고 목이 긴 실린더에 마우스를 강제적으로 수영하게 하는 방법으로 마우스를 직경 15 cm, 높이 25 cm의 투명한 아크릴 원통에 20 cm 높이로 수온 23°C의 물을 채운 뒤에 6분 동안 수영하게 한다. 실험이 종료된 동물은 체온 유지 및 건조를 위해 적외선 등 아래에 30분간 놓아두었다. 수영을 할 때 이를 비디오로 녹화한 뒤

컴퓨터 프로그램(EthoVision 14, Noldus)을 이용하여 분석하였다. 초기에는 수영하고 기어오르는 등의 행동을 보이거나, 결국에는 머리만 떠 있는 상태를 유지하는 움직이지 않는 상태(부동 상태)를 나타낸다. 이러한 부동 상태가 나타나는 시점 및 부동 상태의 시간을 측정하여 분석한다.

자궁지수 및 혈중 Estradiol 측정(Uterine Index and Estradiol Level) – 8주 동안의 경육고 투여와 행동실험이 끝난 마우스의 몸무게를 재고 Avertin 마취하에 심장 채혈하였다. 채혈한 혈액을 헤파린 처리되어 있는 vacutainer에 넣고 원심 분리하여 혈장(plasma)을 얻어 초저온 냉동고에 저장 후 혈중 estradiol의 농도를 ELISA kit(Cayman Chemical, Michigan, USA)를 이용하여 측정하였다. 혈액 채취 후 부검하여 자궁을 적출하여 무게를 측정하였다. 자궁지수(Uterine Index)는 아래와 같이 계산하였다.

$$\text{자궁지수(Uterine Index)} = (\text{자궁무게/체중}) \times 100$$

Western Blot Analysis – 8주간 경육고(200, 600과 1800 mg/kg)를 경구투여하였으며, 마지막 투여가 있는 60분 후, 마우스를 치사하여 뇌를 적출하였다. 적출한 뇌로부터 대뇌 피질과 해마를 분리한 뒤, 각 무게의 10배에 해당하는 냉각시킨 용액 [1mM PMSF, 1 mM orthovanadate, 1 mM sodium fluoride, 1 mM EDTA, 0.32 M sucrose, protease inhibitor (50 mL용액 당 1정)]을 첨가한 20 mM Tris-HCl buffer] 에 넣어 균질화하였다. 균질액은 4°C에서 14,000 rpm으로 20분간 원심 분리한 후 새로운 tube에 상층액을 옮긴 후 단백질을 정량하여 사용하였다. 단백질의 정량은 Western blotting ECL kit(Amersham Co., England)를 사용하여 실시하였으며, 단백질(30 µg)을 SDS-polyacrylamide gel(15%)에 reducing condition에서 전기 영동을 실시하였다. 단백질을 PSDF membrane에 transfer buffer[192 mM glycine 및 20% v/v methanol을 포함하는 25 mM Tris-HCl(pH 7.4)]를 이용하여 100 V로 4°C에서 2시간 동안 이전시켰다. 이전 후 membrane을 상온에서 2시간 동안 blocking solution(5% skim milk)으로 blocking을 실시한 다음, 각 권고되는 비율로 희석한 1차 항체를 가하여 4°C에서 24시간 동안 배양하였다. 배양시킨 membrane을 Tris-buffered saline/Tween 20으로 5회 세척 후 1:3000으로 희석시킨 2차 항체로 2시간 동안 incubation하였다. 이후 enhanced chemiluminescence (ECL)로 발광시켜 LAS-4000 mini bio-imaging program (Fujifilm Lifescience, Stamford, CT, USA)을 이용하여 분석한 뒤 membrane을 20% glycine 용액으로 상온에서 20분 동안 stripping하였다.

통계처리 – 모든 실험결과는 mean ± S.E.M.으로 나타내었다. Y자 미로 시험 및 Western blot 실험결과는 일원분산분석(One-way ANOVA)을 이용하여 통계적 유의성 여부를 판단하였고, 유의적인 차이가 있을 경우에 사후 검증으로

Turkey test를 실시하여 군간의 유의적 차이를 비교하였다. 새로운 물체 인식 시험은 이원분산분석을 이용하여 통계적 유의성 여부를 판단하였고, 유의적인 차이가 있을 경우 Bonferroni post-tests방법을 이용하여 군간의 유의성을 검정하였다. 모든 실험결과는 95% 신뢰 수준 이하에서 실시하였으며, 유의성 검증은 p값이 0.05 이하인 경우로 하였다.

결과 및 고찰

새로운 물체 인지도 평가 – 새로운 물체 인지 시험은 인식 기억(recognition memory)을 평가하는 실험으로 경육고 투여로 새로운 물체에 대한 인지도능을 확인하였다. 갱년기

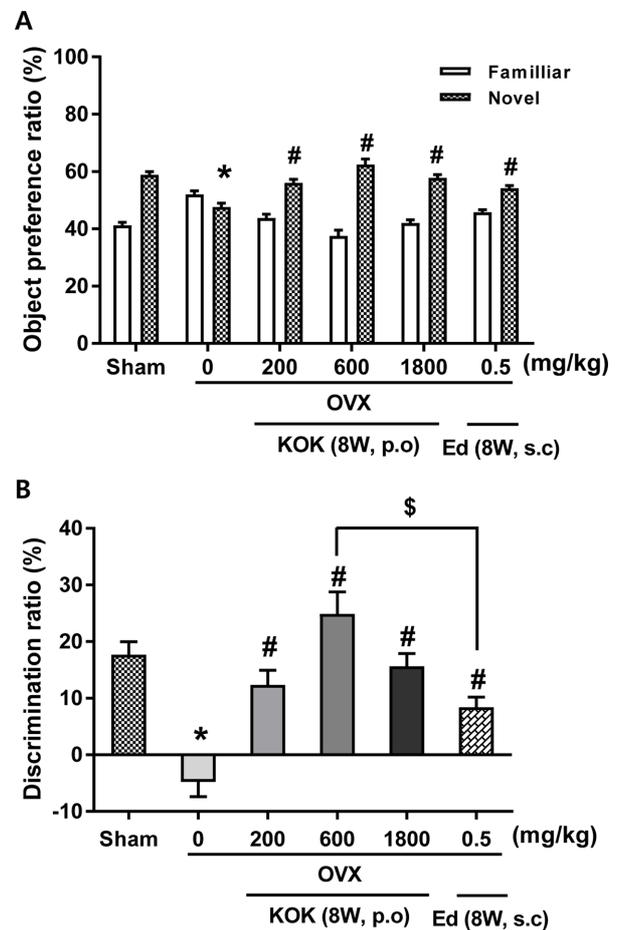


Fig. 1. The ameliorating effect of Kyung-Ok-Go on novel object recognition memory in ovariectomy-induced memory deficit in mice. The object preference ratio (A) and discrimination ratio (B) were presented. The results were expressed as mean means ± S.E.M (n = 8-10/group). (*P < 0.05, compared to the sham control group; #P < 0.05, compared to the ovariectomized group; \$P < 0.05, compared to the estradiol treatment group). OVX, Ovariectomized group. KOK, Kyung-Ok-Go. Ed, estradiol.

여성의 경우 인식기억이 현저히 감소해 있다는 사실이 잘 알려져 있다.^{20,21)} 일원분산분석 결과 각 투여군에서 유의적인 차이를 확인하였다[F (5, 53) = 14.57, $P < 0.0001$](Fig. 1A). 난소절제술을 시행한 동물에서 새로운 물체에 대한 탐색 시간이 정상 대조군과 비교했을 때 유의적($P < 0.001$)으로 감소되었음을 확인하였으며, 이는 갱년기 동물모델에서의 인지능의 감퇴 및 장애가 나타남을 의미한다. 난소절제로 유도된 갱년기 동물에 경옥고를 8주간 경구 투여했을 때 200 mg/kg, 600 mg/kg, 1800 mg/kg에서 새로운 물체에 대한 관심도가 유의성 있게 증가하였다($P < 0.05$)(Fig. 1A). 차별 비율도 경옥고의 모든 농도와 estradiol군에서 증가하였으며, 특히 경옥고 600 mg/kg 용량은 estradiol 그룹과 비교했을 때 유의적인 효과를 관찰할 수 있었다(Fig. 1B). 따라서 경옥고 투여가 갱년기 동물모델에서 인식 기억의 개선 효과

가 있음을 확인하였다.

Y자 미로 기억력 평가 - 난소절제(OVX)로 유도된 기억력 장애 동물모델에서 경옥고 200 mg/kg, 600 mg/kg 및 1800 mg/kg의 용량으로 8주간 투여하여 단기 기억 개선 효과를 Y자 미로 시험을 이용하여 확인하였다. 일원분산분석 결과 각 투여군에서 변경 행동력에 유의적인 차이를 확인하였다[F (5, 51) = 5.06, $P < 0.001$](Fig. 2A). 난소절제된 동물(OVX)에서 정상동물 대비 변경 행동력(spontaneous alternation, %)의 감소를 확인하였으나 통계적으로 유의적인 차이를 나타내지는 못하였다($p = 0.064$). 이러한 감소는 estradiol 투여에 의해 유의적으로 증가하였으며, 경옥고를 8주 동안 투여했을 때 200 mg/kg, 600 mg/kg 및 1800 mg/kg에서 농도 의존적으로 변경 행동력이 증가함을 확인하였다. 또한, 600과 1800 mg/kg에서 난소절제군(OVX)에 비해 유의적으로 변경 행동력이 증가되어(Fig. 2A), 난소절제된 동물에서 8주간의 경옥고 장기투여로 인해 단기 기억이 회복되었음을 확인하였다. 그러나 4주간의 경옥고 투여에서는 유의적인 변화를 관찰할 수 없었다(data not shown). 이러한 경옥고의 효능은 실험동물이 Y자 미로 가지에 들어간 총 횟수에는 영향을 미치지 않았다(Fig. 2B).

우울증 개선 효과 시험(Forced Swimming Test) - 갱년기 동물모델에서 8주간의 경옥고 투여로 인한 우울감 개선을 확인하기 위하여 강제 수영 시험을 수행한 결과, 각 군에 유의적인 차이가 있음을 확인하였다[일원분산분석, F (5, 53) = 4.069, $P < 0.01$](Fig. 3). 음성대조군(OVX)은 대조군에 비해 부동 상태의 시간이 유의적으로 증가되는 것을 확인할 수 있으며($P < 0.05$), 8주 동안 경옥고 600 mg/kg과 1800

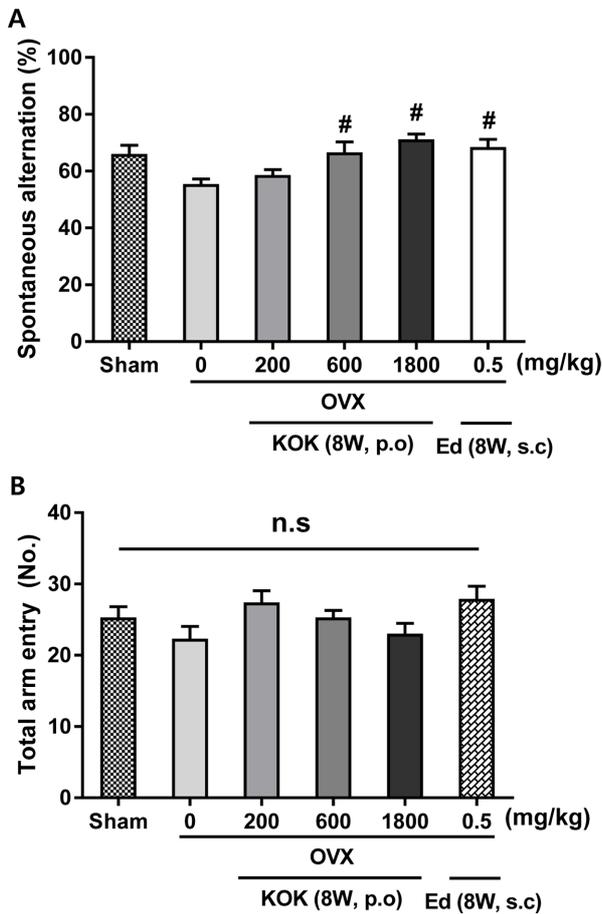


Fig. 2. The ameliorating effect of Kyung-Ok-Go in Y-maze test on ovariectomy-induced memory deficit in mice. The spontaneous alteration (A) and total arm entry (B) of mice were presented. Each data was expressed as means \pm S.E.M (n = 8-10/group). (* $P < 0.05$, compared to the sham control group; [#] $P < 0.05$, compared to the ovariectomized group). OVX, Ovariectomized group. KOK, Kyung-Ok-Go. Ed, estradiol.

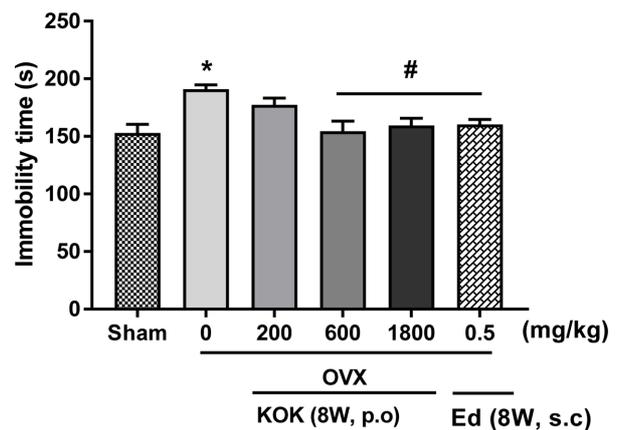


Fig. 3. The ameliorating effect of Kyung-Ok-Go on ovariectomy-induced depression in mice measured in forced swimming test. The immobility time of mice were presented. Each data was expressed as means \pm S.E.M (n = 8-10/group). (* $P < 0.05$, compared to the sham control group; [#] $P < 0.05$, compared to the ovariectomized group). OVX, Ovariectomized group. KOK, Kyung-Ok-Go. Ed, estradiol.

mg/kg 투여군과 estradiol 투여군에서 부동 상태의 시간이 음성대조군 보다 유의성 있게 감소함을 관찰하였다($P<0.05$). 따라서 난소절제로 유도된 우울증 모델 마우스에서 경옥고 8주(600와 1800 mg/kg) 투여가 우울증 개선 효과를 나타낼 수 있음을 확인하였다.

자궁지수 및 혈중 Estradiol 측정(Uterine Index and Estradiol Level) – 경옥고 장기투여로 인해 개선된 인지능력과 우울감이 난소절제 동물모델에서의 estrogen 양의 변화에 의한 것인지 확인하기 위해, 자궁의 크기변화 및 혈중 estradiol의 양을 측정하였다. 일원분산분석결과 각 군에서 자궁지수 및 혈중 estradiol 수치에 유의적인 차이를 확인하였다[자궁지수, $F(5, 53) = 168.8, P<0.0001$, Table I; 혈중 estradiol, $F(5, 42) = 48.83, P<0.0001$, Table II]. 난소절제

Table I. The effects of Kyung-Ok-Go on uterine weight and uterine index in ovariectomized mice

Group	Uterine (mg)	Uterine index
Sham	174.1±14.5	0.51±0.04
OVX	25.1±2.2***	0.08±0.01***
OVX+ KOK 200 mg/kg (8 weeks, p.o)	24.8±1.4	0.08±0.00
OVX+ KOK 600 mg/kg (8 weeks, p.o)	32.8±7.5	0.07±0.00
OVX+ KOK 1800 mg/kg (8 weeks, p.o)	24.0±0.8	0.08±0.00
OVX+ estradiol 0.5 mg/kg (twice/week, s.c)	202.8±4.0####	0.59±0.01####

Each data was expressed as mean means ± S.E.M (n = 8-10/group). (***) $P<0.001$, compared to the sham control group; #### $P<0.001$, compared to the ovariectomized group). OVX, Ovariectomized group. KOK, Kyung-Ok-Go.

Table II. The effects of Kyung-Ok-Go on the level of β -estradiol in blood of ovariectomized mice

Group	β -Estradiol (pg/ml)
Sham	37.7±2.1
OVX	12.7±1.9***
OVX+ KOK 200 mg/kg (8 weeks, p.o)	14.0±0.7
OVX+ KOK 600 mg/kg (8 weeks, p.o)	14.5±1.6
OVX+ KOK 1800 mg/kg (8 weeks, p.o)	13.3±1.0
OVX+ estradiol 0.5 mg/kg (twice/week, s.c)	40.7±3.1####

The results were expressed as mean means ± S.E.M (n = 8/group). (***) $P<0.001$, compared to the sham control group; #### $P<0.001$, compared to the ovariectomized group). OVX, Ovariectomized group. KOK, Kyung-Ok-Go.

된 동물에서 대조군에 비해 자궁지수 및 혈중 estradiol 수치가 유의적으로 감소함을 확인하였으며($P<0.05$), 또한, estradiol 투여에 의해 난소절제된 동물에서 감소된 자궁지수 및 혈중 estradiol 수치가 대조군 수준으로 개선됨을 확인하였다($P<0.05$). 하지만 경옥고 장기투여에 의해 개선되지 못함을 확인하였다($P>0.05$). 이러한 결과는 경옥고 장기투여로 나타난 갱년기 증후군 개선효과가 여성호르몬 분비 촉진으로 나타난 것이 아님을 시사한다.

mBDNF 발현에 미치는 경옥고의 효과 – 경옥고의 갱년기 증상 개선효과를 규명하고자, 해마 부위의 mature brain derived neurotrophic factor(mBDNF)의 발현정도를 파악하였다. 대뇌 중 해마에 estrogen 수용체가 다수 존재하며, estrogen의 자극에 의해 mBDNF의 양이 조절됨이 보고되었으며, 혈중 estrogen 수치 저하로 인해 나타나는 인지능력 저하와 우울감이 mBDNF의 양의 변화와 밀접한 관계가 있음이 밝혀져있다.^{22,23} 따라서 경옥고 장기투여에 의한 갱년기 동물모델에서의 인지능력 및 우울감 개선 효과가 mBDNF 발현 증가와 관련이 있을 것으로 생각되어 해마부위에서의 mBDNF 발현양을 Western blot을 통해 확인하였다. 일원분

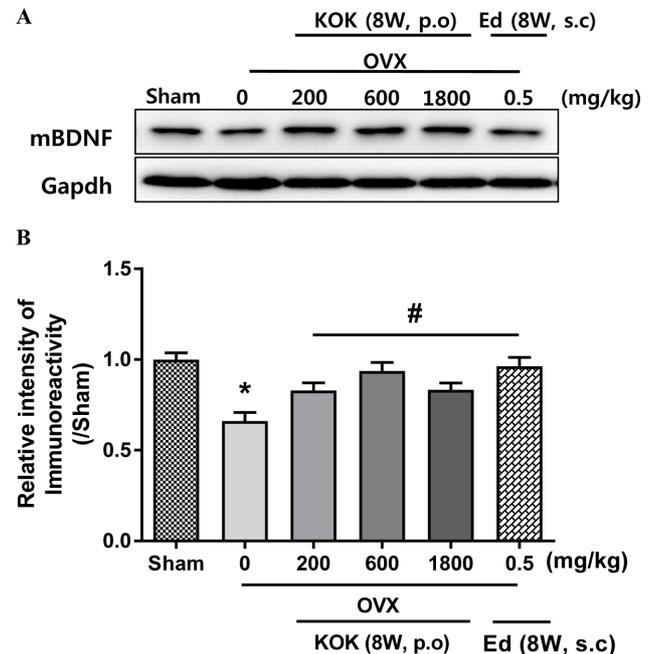


Fig. 4. The expression levels of mBDNF in hippocampal tissue were measured by western blot analysis. The representative immunoblot of mBDNF and Gapdh were presented (A). The immunoreactivity of mBDNF/Gapdh was normalized to the sham control group (taken as 1.0) (B). The results were expressed as means ± S.E.M (n = 6/group). (* $P<0.05$, compared to the sham control group; # $P<0.05$, compared to the ovariectomized group). OVX, Ovariectomized group. KOK, Kyung-Ok-Go. Ed, estradiol.

산분석결과 각 군에서 mBDNF 발현양에 유의적인 차이를 확인하였다[F (5, 30) = 8.904, P < 0.0001, Fig. 4]. 난소절제된 동물에서 대조군 대비 유의적으로 mBDNF 발현양이 감소함을 확인하였으며(P < 0.05), 난소절제로 유도된 mBDNF 발현감소가 경옥고 200, 600 및 1800 mg/kg 장기투여와 estradiol 투여에 의해 회복됨을 확인하였다(P < 0.05). 이는 경옥고 장기투여에 의해 개선된 인지능력과 우울감이 해마의 mBDNF 발현양 증가를 통해 나타났다는 것을 시사한다.

본 연구에서는 경옥고 장기투여를 통해 갱년기에 발생하는 다양한 증후군 중 인지능력과 우울감 개선 효과를 검증하기 위하여 난소 절제술로 유도한 갱년기 동물모델을 이용하여, 인지능력을 평가할 수 있는 새로운 물체 인지능 평가와 Y자 미로 시험을 진행하였으며, 우울감을 평가할 수 있는 강제수영실험을 진행하였다. 새로운 물체 인지능 평가에서는 경옥고, estradiol 투여 그룹에서 모두 갱년기로 인해 감소되었던 인지능력이 모든 용량에서 새로운 물체에 대한 관심도가 유의성 있게 증가됨을 확인할 수 있었다. 또한, 단기기억을 평가하는 Y자 미로 시험(Y-maze task)에서는 경옥고 8주 투여 시 감소되었던 기억력이 농도 의존적으로 증가하는 경향을 보이며, 600 및 1800 mg/kg 용량에서는 유의성 있는 증가를 보여 단기기억 개선에 효과가 있음을 확인하였다. 난소절제로 유도된 갱년기 동물모델에서 강제수영 실험을 실시한 결과, 난소 절제로 인한 우울감 및 의욕저하는 8주간 경옥고 600 및 1800 mg/kg 투여에 의해 정상대조군 수준으로 개선됨을 확인하였다. 이러한 결과를 통해 경옥고 장기투여가 갱년기에서 보여지는 인지능력 저하와 우울감을 개선시킬 수 있음을 확인하였다.

경옥고 장기투여를 통해 나타난 인지능력 및 우울감 개선 효과의 원인을 규명하고자 자궁지수와 혈중 estradiol 수치를 측정된 결과, 난소절제를 통해 저하된 자궁지수와 혈중 estradiol 수치를 경옥고 장기투여가 개선하지 못함을 확인하였다. 이는 경옥고 장기투여를 통해 나타난 갱년기 증후군 개선효과가 여성호르몬 분비와는 관련이 없음을 시사한다.

Estrogen은 대표적인 여성호르몬으로 다양한 생리활성을 전달한다. 신체 내 다양한 장기 중, 대뇌에 estrogen 수용체 수가 매우 많으며, estrogen은 대뇌피질 및 해마에서 신경세포의 산화적 스트레스 및 세포성장에 중요한 역할을 하는 것으로 알려졌다.^{24,25)} 또한, estrogen 수치 저하가 해마의 mBDNF 발현량의 변화를 일으켜 인지능력 및 우울감을 유발할 수 있음이 제시되었다.^{26,27)} 따라서 본 연구진은 경옥고 장기투여에 의해 나타난 인지능력 및 우울감 개선효과가 해마의 mBDNF 발현과 관계가 있을 것으로 생각하여, Western blot을 통해 해마 내 mBDNF 발현을 확인하였다. 그 결과, 난소절제 동물에서 정상 대조군에 비해 유의적으로 mBDNF 발현이 감소됨을 확인하였으며, 경옥고가 이를 증가시킴을 확인하였다. 이는 경옥고의 갱년기 증후군 개선

효과가 해마 mBDNF 발현 증가를 통해 나타났음을 시사한다.

결 론

본 연구에서는 경옥고가 여성 갱년기 증상의 개선과 예방에 사용될 수 있을지 여부를 ‘난소 절제된 동물모델’을 이용하여 평가하고자 하였다. 본 연구를 통해 경옥고 장기투여가 갱년기 동물모델에서 인지능 및 우울감 개선이 가능함을 확인하였으며, 이러한 개선효과가 해마의 mBDNF 발현 증가를 통해 나타남을 확인하였다. 경옥고 효능에 대한 다양한 연구가 이루어지고 있으나, 경옥고가 일반의약품 중 자양강장제로 분류되어 다른 적응증 관련 임상연구가 미미하지만, 임상적 이용에서 이미 안전성이 입증된 바 있기 때문에,²⁸⁾ 향후 갱년기 증후군 치료를 목적으로 경옥고에 대한 임상연구가 실시되어 갱년기 증후군의 치료제로서의 경옥고의 사용가능성이 기대된다.

사 사

이 논문은 광동제약 및 한국연구재단의 증견 연구자 지원 사업 과제(2018R1A2A2A05023165)의 재원으로 수행한 연구임.

인용문헌

1. Takahashi, T. A. and Johnson, K. M. (2015) Menopause. *Med. Clin. North Am.* **99**: 521-534.
2. Delamater, L. and Santoro, N., (2018), Management of the perimenopause' *Clin. Obstet. Gynecol.* **61**: 419-432.
3. Rymer, J. and Morris, E. P. (2000) "Extracts from "clinical evidence": Menopausal symptoms. *BMJ.* **321**: 1516-1519.
4. Vegunta, S., Kling, J. M. and Kapoor, E. (2020) Androgen therapy in women. *J. Women's Health (Larchmt).* **29**: 57-64.
5. Dizavandi, F. R., Ghazanfarpour, M., Roozbeh, N., Kargarfard, L., Khadivzadeh, T. and Dashti, S. (2019) An overview of the phytoestrogen effect on vaginal health and dyspareunia in peri- and post-menopausal women. *Post Reprod. Health.* **25**: 11-20.
6. Rietjens, I., Lousse, J. and Beekmann, K. (2017) The potential health effects of dietary phytoestrogens. *Br. J. Pharmacol.* **174**: 1263-1280.
7. Lee, Y. J., Jin, Y. R., Lim, W. C., Park, W. K., Cho, J. Y., Jang, S. and Lee, S. K. (2003) Ginsenoside-rb1 acts as a weak phytoestrogen in mcf-7 human breast cancer cells. *Arch. Pharm. Res.* **26**: 58-63.
8. Nakaya, Y., Mawatari, K., Takahashi, A., Harada, N., Hata, A. and Yasui, S. (2007) The phytoestrogen ginsenoside re activates potassium channels of vascular smooth muscle cells through pi3k/akt and nitric oxide pathways. *J. Med. Invest.* **54**: 381-384.

9. Lau, W. S., Chan, R. Y., Guo, D. A. and Wong, M. S. (2008) Ginsenoside rg1 exerts estrogen-like activities via ligand-independent activation of α pathway. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **108**: 64-71.
10. Kim, H. J., Jung, S. W., Kim, S. Y., Cho, I. H., Kim, H. C., Rhim, H., Kim, M. and Nah, S. Y. (2018) *Panax ginseng* as an adjuvant treatment for alzheimer's disease. *J. Ginseng Res.* **42**: 401-411.
11. Lee, B., Shim, I., Lee, H. and Hahm, D. H. (2011) *Rehmannia glutinosa* ameliorates scopolamine-induced learning and memory impairment in rats. *J. Microbiol. Biotechnol.* **21**: 874-883.
12. Lee, Y., Gao, Q., Kim, E., Lee, Y., Park, S. J., Lee, H. E., Jang, D. S. and Ryu, J. H. (2015) Pretreatment with 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde blocks scopolamine-induced learning deficit in contextual and spatial memory in male mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **134**: 57-64.
13. Bae, E. A., Hyun, Y. J., Choo, M. K., Oh, J. K., Ryu, J. H. and Kim, D. H. (2004) Protective effect of fermented red ginseng on a transient focal ischemic rats. *Arch. Pharm. Res.* **27**: 1136-1140.
14. Cai, M., Shin, B. Y., Kim, D. H., Kim, J. M., Park, S. J., Park, C. S., Won do, H., Hong, N. D., Kang, D. H., Yutaka, Y. and Ryu, J. H. (2011) Neuroprotective effects of a traditional herbal prescription on transient cerebral global ischemia in gerbils. *J. Ethnopharmacol.* **138**: 723-730.
15. Lee, S. and Rhee, D. K. (2017) Effects of ginseng on stress-related depression, anxiety, and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *J. Ginseng Res.* **41**: 589-594
16. Huang, Y. J., Hsu, N. Y., Lu, K. H., Lin, Y. E., Lin, S. H., Lu, Y. S., Liu, W. T., Chen, M. H. and Sheen, L. Y. (2020) *Poria cocos* water extract ameliorates the behavioral deficits induced by unpredictable chronic mild stress in rats by down-regulating inflammation. *J. Ethnopharmacol.* **258**: 112566.
17. Zhou, X. D., Shi, D. D. and Zhang, Z. J., (2019), Ameliorative effects of radix rehmanniae extract on the anxiety- and depression-like symptoms in ovariectomized mice: A behavioral and molecular study. *Phytomedicine* **63**: 153012.
18. Park, S. B., Lee, Y. J. and Chung, C. K. (2010) Bone mineral density changes after ovariectomy in rats as an osteopenic model: Stepwise description of double dorso-lateral approach. *J. Korean Neurosurg. Soc.* **48**: 309-312.
19. Tadotsu, D., Kawate, N. and Tamada, H. (2018) Rescue of the fetal damage associated with high intrauterine pressure by 17beta-estradiol injection in ovariectomized progesterone-treated pregnant mice. *Endocr. J.* **65**: 1219-1224.
20. Hogervorst, E. and Bandelow, S. (2009) Brain and cognition. Is there any case for improving cognitive function in menopausal women using estrogen treatment? *Minerva Ginecol.* **61**: 499-515.
21. Fonseca, C. S., Gusmao, I. D., Raslan, A. C., Monteiro, B. M., Massensini, A. R., Moraes, M. F. and Pereira, G. S. (2013) Object recognition memory and temporal lobe activation after delayed estrogen replacement therapy. *Neurobiol. Learn. Mem.* **101**: 19-25.
22. Chhibber, A., Woody, S. K., Karim Rumi, M. A., Soares, M. J. and Zhao, L. (2017) Estrogen receptor beta deficiency impairs bdnf-5-ht2a signaling in the hippocampus of female brain: A possible mechanism for menopausal depression. *Psychoneuroendocrinology* **82**: 107-116.
23. Scharfman, H. E. and MacLusky, N. J. (2006) Estrogen and brain-derived neurotrophic factor (bdnf) in hippocampus: Complexity of steroid hormone-growth factor interactions in the adult cns. *Front. Neuroendocrinol.* **27**: 415-435.
24. Scheyer, O., Rahman, A., Hristov, H., Berkowitz, C., Isaacson, R. S., Diaz Brinton, R. and Mosconi, L. (2018) Female sex and alzheimer's risk: The menopause connection. *J. Prev. Alzheimers Dis.* **5**: 225-230.
25. Solum, D. T. and Handa, R. J. (2002) Estrogen regulates the development of brain-derived neurotrophic factor mrna and protein in the rat hippocampus. *J. Neurosci.* **22**: 2650-2659.
26. Scharfman, H. E. and Maclusky, N. J. (2005) Similarities between actions of estrogen and bdnf in the hippocampus: Coincidence or clue? *Trends Neurosci.* **28**: 79-85.
27. Lalert, L., Kruevaisayawan, H., Amatyakul, P., Ingkaninan, K. and Khongsombat, O. (2018) Neuroprotective effect of asparagus racemosus root extract via the enhancement of brain-derived neurotrophic factor and estrogen receptor in ovariectomized rats. *J. Ethnopharmacol.* **225**: 336-341.
28. Kim, K. I., Kong, M., Lee, S. H. and Lee, B. J. (2019) The efficacy and safety of kyung-ok-ko on cancer-related fatigue in lung cancer patients: Study protocol for a randomized, patients-assessor blind, placebo-controlled, parallel-group, single-center trial. *Medicine (Baltimore)* **98**: e17717.

(2020. 9. 29 접수; 2020. 11. 9 심사;
2020. 12. 3 게재확정)